No 9. **G. Anders** und **H. Ursprung**, Zürich. — Bildung von Pigmentschollen im Auge von *Drosophila melanogaster* nach experimenteller Schädigung der Imaginalanlagen. (Mit einer Textabbildung.)

Aus dem zoologisch-vergl.-anatomischen Institut der Universität Zürich[1].

Herrn Prof. Dr. **Hans Steiner** zum 70. Geburtstag.

Einleitung und Problemstellung

Die Augenfarbstoffe von *Drosophila melanogaster* lassen sich zwei Substanzgruppen zuordnen: die roten Pigmente sind Pterine (Viscontini, Hadorn und Karrer, 1957), die braunen gehören zu den Ommochromen (vgl. Kühn, 1956). Über Genetik und Pathologie der Ommochrombildung sind zahlreiche Einzelheiten bekannt. So wird bei vielen Mutanten der *lozenge* Pseudoallelgruppe, deren Hauptmerkmal eine komplexe Augenmissbildung ist (Literatur bei Anders, 1955), Ommochrompigment in Gestalt grober, karminroter Schollen abgelagert, deren Volumen ein Vielfaches der normalen Pigmentgranula betragen kann. Wie diese Konkrementbildung in den Augen der *lozenge* Mutanten zustandekommt, ist bisher nicht bekannt.

Nun lassen sich solche Ommochrom-Ablagerungen experimentell auch in den Malpighischen Gefässen herbeiführen, die normalerweise keine Ommochrompigmente enthalten (Ursprung, Graf und Anders, 1958). Im Anschluss an diese Beobachtung stellte sich die Frage, ob experimentell im Auge der Wildfliege die Bildung abnormer Ommochrom-Konkremente ausgelöst werden könne. Damit würde ein weiterer Beitrag zum Verständnis des *lozenge* Manifestationsmusters geleistet.

[1] Herrn Prof. Dr. E. Hadorn sind wir für die grosszügige Förderung unserer Arbeit sehr zu Dank verpflichtet.

Material und Methode

Wir verwendeten für unsere Versuche den Wildstamm *Sevelen* und einen *vermilion* Stamm. Augen-Imaginalscheiben verpuppungsreifer Larven wurden nach der bei Ursprung, Graf und Anders (1958) für Malpighische Gefässe beschriebenen Methode *in vitro* mit kurzwelligem UV bestrahlt und anschliessend in gleichalte Larven implantiert. In einigen Versuchsserien wurde eine Augenanlage von 12 h alten Puppen unmittelbar nach der Kopf-Ausstülpung von der Seite her *in situ* bestrahlt; dazu musste das Puparium über der Augenscheibe entfernt werden. In einer weiteren Versuchsanordnung teilten wir larvale Augenscheiben *in vitro* durch parallele Einschnitte mit Wolframnadeln in 5—6 schmale Gewebestreifen auf, die alle durch die unversehrt gelassene Antennenanlage in Verbindung blieben. Diese mechanisch geschädigten Imaginalscheiben implantierten wir ebenfalls in Wirtslarven. Für die mikroskopische Untersuchung wurden die Implantate resp. die *in situ* bestrahlten Augen nach der Metamorphose in 0,9% NaCl zu Quetschpräparaten verarbeit. Einige Objekte fixierten wir in Carnoy'scher Flüssigkeit und schnitten sie nach Einbettung in Paraffin (7—10 μ).

Ergebnisse

Aus früheren Untersuchungen an verschiedenen Allelen der Mutante *lozenge* wussten wir, dass die Menge des abnormen Pigmentes je nach Expressivität des Allels stark schwanken kann, wobei starke Allele zahlreiche und grosse Ommochromschollen aufweisen, bei schwächeren Allelen hingegen nur einzelne Körner zu finden sind (Anders, unveröffentlicht). Im Auge der Wildform konnten jedoch bei zahlreichen Stichproben nie abnorme Konkremente gefunden werden. Dementsprechend werteten wir bei der vorliegenden Untersuchung die Feststellung von mindestens einer klar abgrenzbaren Pigmentscholle in einem behandelten Auge als positiven Befund. Nicht selten waren behandelte Augen mit zahlreichen Konkrementen durchsetzt. Es war jedoch nicht das Ziel der Arbeit, das Ausmass dieser Schwankungen quantitativ zu erfassen. — Unsere Ergebnisse sind in der Tabelle S. 263 zusammengestellt.

Die Pigmentschollen sind im Gegensatz zu den gelben bis zinnoberrroten normalen Pigmentgranula leuchtend karminrot. Ihre Form ist unregelmässig kantig. Der Durchmesser beträgt meist ein bis mehrere μ. Die häufig auftretenden Agglomerate von Schollen sind entsprechend grösser. Vorläufig haben wir keine Anhaltspunkte dafür, dass die Schollen durch Zusammenballung normaler Pigmentgranula entstehen würden. Die Tatsache, dass sie ab und zu als längliche, geometrisch klar abgegrenzte, kristallähnliche Gebilde auftreten, spricht gegen eine Herkunft aus normalen Pigmentgranula. Sowohl im frischen Quetschpräparat, als auch auf Schnitten fanden wir die Pigmentschollen mitten unter normalen Pigmentgranula. Es ist deshalb anzunehmen, dass sie genau wie in den Malpighischen Gefässen intrazellulär entstehen. Eine andere Entstehungsweise lässt sich jedoch nicht ausschliessen.

a) *UV-bestrahlte Imaginalscheiben* (Versuchsserie A, Tab. S. 263, Abb. 1).

Meist erfolgte hier eine Reduktion des pigmenthaltigen Augenteils auf 1/3 bis 1/10 des Volumens eines unbehandelten Implantats. Die Schädigung durch Bestrahlung beschränkt sich aber nicht auf das Pigment. Auch die Chitinstrukturen werden betroffen. Die wenigen Fazetten, die wir beobachten konnten, waren selten gut ausgebildet; meist fehlten die Fazettenborsten. Die Rhabdomeren waren häufig verkürzt oder fehlten. Das Gesamtbild des geschädigten Auges ähnelt sehr dem Phänotypus starker *lozenge* Allele.

Von 44 implantierten Augenscheiben entwickelten 43 normales rotes Pigment; in 26 dieser pigmentierten Implantate wurden neben normalen Farbstoffgranula Pigmentschollen gefunden. Ein einziges Implantat entwickelte nur Chitinstrukturen (Tab. S. 263, A).

b) *in situ bestrahlte Augen junger Puppen* (Serie E).

Die allgemeine Morphologie der Schädigung entspricht den soeben beschriebenen Befunden bei behandelten Imaginalscheiben. Da durch die Bestrahlung der Puppen ausser der Augenanlage auch mehr oder weniger grosse benachbarte Zellbereiche getroffen werden, sind alle Tiere schlüpfunfähig und müssen zur Untersuchung aus dem Puparium herauspräpariert werden. Der Tod erfolgt

nicht selten auf dem Bestrahlungsstadium vor jeglicher Ausfärbung. Unsere Daten beziehen sich auf diejenigen Tiere, die nach vollständiger Entwicklung untersucht wurden.

Von 29 sezierten Tieren fanden wir bei 21 abnorme Pigmentschollen. Die Zahl der Schollen war durchwegs kleiner als bei den larval bestrahlten Organen.

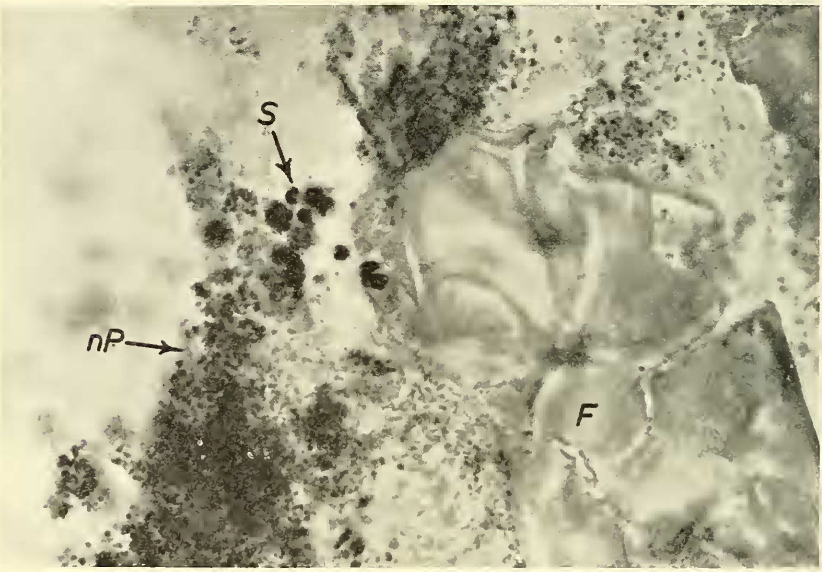


Abb. 1.

Mikrophotographie eines Quetschpräparates der Versuchsserie A. F, Fazettenchitin; nP, normale Pigmentgranula; S, Pigmentschollen. Vergrösserung ca. 1000 ×.

c) *Weitere Behandlungsergebnisse* (Serie D).

Von unseren Versuchen an Malpighischen Gefässen her wussten wir, dass ein einfaches mechanisches Trauma die Bildung von Ommochrompigment bewirken kann. Die Befunde an einigen nach der auf S. 260 angegebenen Weise aufgeteilten Imaginalscheiben bestätigen diese Ergebnisse. Alle 6 behandelten Implantate bildeten ansehnliche Mengen von Pigmentschollen.

Auch die Behandlung von Augen-Imaginalscheiben mit alkalischem Trypsin führt zur Pigmentschollen-Bildung. (Wir sind Herrn Prof. Dr. Hadorn für die Überlassung dieses unveröffentlichten Befundes zu Dank verpflichtet.)

Tabelle.

Versuchsanordnungen und Ergebnisse. n, *Anzahl untersuchte Implantate resp.* in situ *bestrahlte Augen. In Serie E kamen nur solche Augen zur mikroskopischen Untersuchung, die bei schwacher Binokularvergrösserung sichtbar pigmentiert waren (29).*

Serie	Spender	Behandlung der Implantate	Wirt	n	Implantate mit Pigment	davon mit Pigment-schollen
A	+	10-15 Min. UV	+	44	43	26
B	*v*	10-12 Min. UV	*v*	26	23	0
C	*v*	10 Min. UV	+	14	7	5
D	+	mechanische Schädigung	+	6	6	6
E	Bestrahlung von pupalen + Augen *in situ*, 1—20 Min. UV			29	(29)	21

d) *Die Natur der pathologischen Pigmentschollen* (Serien B und C).

Durch die Kombination des Gens *vermilion (v)* mit dem Faktor *lozenge* wurde bereits gezeigt, dass die *lozenge*-Pigmentschollen Ommochromnatur haben (Anders, 1955). Dasselbe wurde für die Schollen der traumatisierten Malpighischen Gefässe nachgewiesen (Ursprung, Graf und Anders, 1958).

Um diese Verhältnisse im Rahmen unserer Experimente abzuklären, bestrahlten wir *v* Augenscheiben und implantierten sie sowohl in *v*, als auch in Wildwirte. Bei 7 *v* Implantaten, die in Wildwirten Pigment des Wildtyps entwickelten, fanden wir in 5 Fällen gut ausgebildete Pigmentschollen. Bei 26 *v* Implantaten, die zur Kontrolle in *v* Wirte verpflanzt wurden, fanden wir in keinem einzigen Fall abnorme Schollen. Die Unterschiede zwischen Serie B und C sind mit $\chi^2 = 11$ stark gesichert ($p < 0{,}001$), diejenigen zwischen den Serien A und B mit $\chi^2 = 12$ ($p < 0{,}001$).

Auf Grund dieser Befunde dürfte die Ommochromnatur der Pigmentschollen als erwiesen gelten.

Diskussion

Die strenge Trennung im Schädigungsmuster der Mutante *lozenge* zwischen Pigmenten der Pterin- und der Ommochromreihe ist ein besonders auffallendes biochemisches Phän (Anders, 1955). Aus unseren früheren Untersuchungen an Malpighischen Gefässen geht hervor, dass sich Anomalien im Ommochromstoffwechsel mit unspezifischen Mitteln hervorbringen lassen (Ursprung, Graf und Anders, 1958). Die vorliegenden Versuche zeigen nun, dass, wenn beide Pigmente im Augengewebe dem gleichen experimentellen Trauma ausgesetzt werden, in erster Linie die Ommochromgruppe mit leicht erfassbaren Anomalien reagiert. Diese Befunde entsprechen dem für *lozenge* charakteristischen Wirkungsmuster.

Die Gleichartigkeit der Reaktion auf verschiedenartige Agentien (UV, mechanisches Trauma, Fermenteinwirkung) deutet darauf hin, dass die experimentell ausgelöste Bildung von Pigmentschollen im Auge auf relativ einfache und unspezifische Weise zustandekommt. Die Tatsache, dass Pigmentschollen inmitten von normalen Pigmentgranula und ohne äussere Beziehung zu ihnen entstehen können, lässt vermuten, dass auch im Augenbereich Ommochrom unabhängig von den Pigmentträgern entstehen kann. Dies steht für die Malpighischen Gefässe bereits fest und scheint auch im Bereiche der Hoden möglich zu sein (Goldschmidt und Hadorn, 1959).

Die experimentelle Entstehung von Ommochrom lässt sich jedoch nicht beliebig verwirklichen. Wie wir bei den Versuchen mit der Mutante *vermilion* feststellen konnten, müssen dazu ganz bestimmte genphysiologische Voraussetzungen erfüllt sein.

Wenn wir von unseren Befunden auf die Wirkungsweise des *lozenge* Gens rückschliessen, können wir annehmen, dass die Bildung von Ommochromschollen im *lozenge* Auge kein direktes Produkt der Genaktivität darstellt, sondern als ein von der primären Genwirkung eventuell erheblich entferntes Merkmal aufzufassen ist. Im Zusammenhang mit anderen Befunden (Anders, 1955) lässt sich nun allmählich eine Hierarchie der Phäne im lozenge Wirkungsmuster aufstellen.

Summary

1. Wildtype larval eye discs of *Drosophila melanogaster*, when irradiated with UV-light and transplanted into + hosts, form dark red purple pigment masses in addition to the normally present light red granules.

2. When *vermilion* was used both as donor and host, no pigment masses were detected, whereas *vermilion* discs formed the masses in + hosts. It is concluded that the additional pigment is an ommochrome.

3. The formation of the red masses is not a specific result of UV irradiation. It was also observed after mechanical damage.

LITERATUR

Anders, G. 1955. *Untersuchungen über das pleiotrope Manifestationsmuster der Mutante lozenge-clawless (lz^{cl}) von Drosophila melanogaster.* Z. Vererb. 87, 113-186.

Goldschmidt, E. and E. Hadorn. 1959. *Host-transplant interactions in biosynthesis of Drosophila pteridines.* J. Embryol. Exp. Morphol. (im Druck).

Kühn, A. 1956. *Versuche zur Entwicklung eines Modells der Genwirkungen.* Naturwiss. 43, 25-28.

Ursprung, H., G. E. Graf und G. Anders. 1958. *Experimentell ausgelöste Bildung von rotem Pigment in den Malpighischen Gefässen von Drosophila melanogaster.* Rev. Suisse Zool. 65, 449-460.

Viscontini, M., E. Hadorn und P. Karrer. 1957. *Fluoreszierende Stoffe aus Drosophila melanogaster: die roten Augenfarbstoffe.* Helv. chim. Acta 40, 579-585.